

PCR 実験ガイド

この文書では、PCR 法の原理や実験操作の流れなどの概要を解説します。実際の実験操作の詳細については、各製品の取扱説明書をご参照ください。

—目次—

- 1 PCR の原理
- 2 実験に必要なもの
- 3 実験操作法
- 4 結果の解析

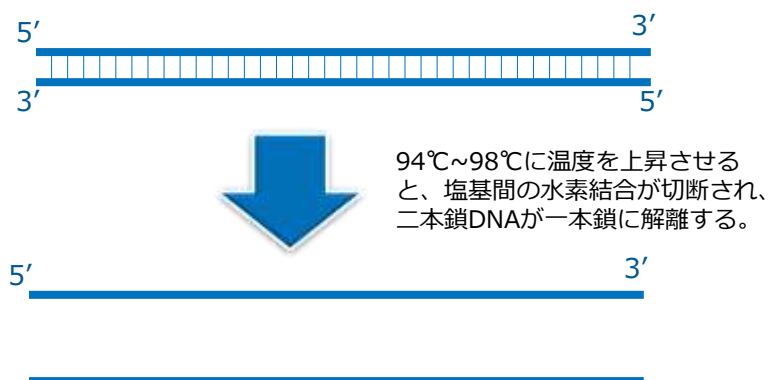
1 PCR の原理

PCR とは？

PCR は、Polymerase Chain Reaction（ポリメラーゼ連鎖反応）の略語で、ごく微量の DNA を出発材料として、高感度の検出を短時間で行うことができる技術です。この方法を用いることにより、DNA の特定の領域を数時間で 100 万倍に増幅することが可能です。

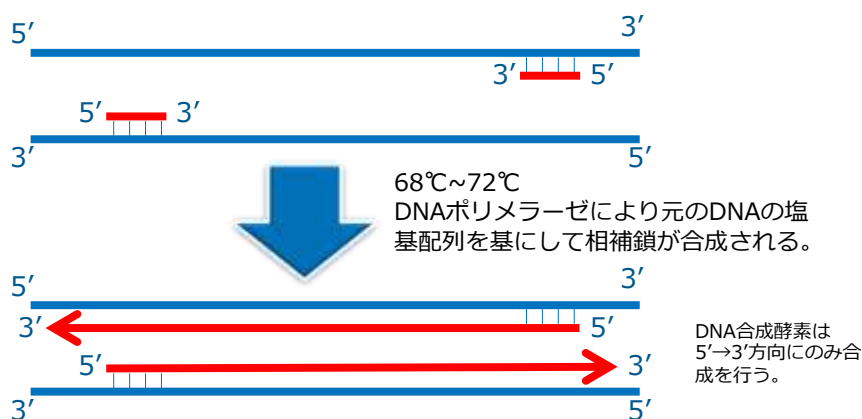
PCR の原理

ステップ 1：鋳型となる二本鎖 DNA を熱変性させて一本鎖 DNA に解離させます。



ステップ 2：一本鎖になった DNA にプライマーを結合させます。

ステップ 3：DNA ポリメラーゼによって元の DNA の相補鎖が合成されます。



以上の 3 ステップの反応を繰り返すを行うことにより、理論的には n 回で 2 の n 乗倍に目的の領域が増幅されます。こうして DNA が数時間で 100 万倍に増幅されます。

2 実験に必要なもの

一般的な実験器具類

マイクロピペット（20, 200, 1000 μ l）およびチップ（フィルター付き）

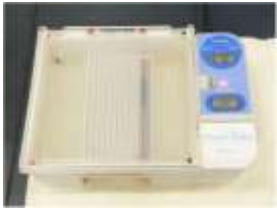
1.5 ml チューブおよびチューブラック

攪拌機（Vortex）

小型遠心機（1.5 ml チューブ用、8 連 0.2 ml チューブ用）など

* 詳細は、別冊の「遺伝子検査の準備と注意事項」をご参照ください。

装置類

器具名称		用途など	
①	PCR装置	逆転写反応やPCR反応に使用します。	
②	電気泳動装置一式	電気泳動槽（右図）の他、ゲル撮影装置が必要です。	

PCR 試薬

タカラバイオでは、公定法収載の O-157 検出用 PCR キットを始めとして、各種食中毒菌検出用 PCR キットの他、あらかじめ 1 反応分の試薬が PCR チューブに分注されている便利な One Shot PCR キットシリーズなど、幅広い製品を取りそろえています。

3 実験操作法

(1) サンプルの調製（エリア 2 で実施）

検体の種類や実験目的に適した方法でサンプルの調製を行います。簡易的な抽出を行う方法としては、熱抽出法やアルカリ熱抽出法があります。高純度な DNA が必要な場合は、DNA 精製キットを使用して調製します。

- * DNA 調製法に関しては、別冊の「DNA/RNA 調製法 実験ガイド」をご参照ください。
- * 実験エリアに関しては、別冊の「遺伝子検査の準備と注意事項」をご参照ください。

(2) PCR 用装置のセッティング（エリア 2 で実施）

使用する PCR 装置に PCR 条件を入力しておきます。

(3) 反応液の調製（エリア 1→3 で実施）

- * 操作方法の詳細は、各製品の取扱説明書をご参照ください。

① 反応液の調製（エリア 1 で実施）

サンプル以外の試薬のマスターミックスを氷上で調製し、PCR 専用チューブに分注し、キャップを軽く閉めます。

12 反応分のマスターミックス調製例

（O-157（ベロ毒素遺伝子）PCR Screening Set（製品コード RR100）の場合）

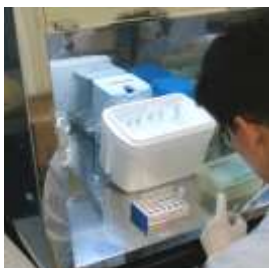
試薬	1 反応当り	12 反応分
10× <i>Ex Taq</i> Buffer	5.0 μ l	60 μ l
dNTP Mixture (各 2.5mM)	4.0 μ l	48 μ l
EVC-1 Primer	0.5 μ l	6 μ l
EVC-2 Primer	0.5 μ l	6 μ l
<i>TaKaRa Ex Taq</i>	0.25 μ l	3 μ l
滅菌水	34.75 μ l	417 μ l

② 陰性コントロールの添加（エリア 1 で実施）

陰性コントロールのチューブに dH₂O を 5 μ l 添加し、チューブのキャップをしっかりと閉めます。

③ サンプルおよび陽性コントロールの添加（エリア 3 で実施）

エリア 3 に移動し、(1)で調製したサンプルおよび陽性コントロールを各 5 μ l 添加し、チューブのキャップをしっかりと閉めます。



PCR 反応液は、コンタミネーション防止のため、クリーンベンチ内で調製します。試薬は、酵素の失活を避けるため、アイスボックス内で氷上で取り扱ってください。

(4) PCR の開始（エリア 2 で実施）

PCR 反応液が入ったチューブを軽くスピンドウンし、PCR 装置にセットし、反応を開始します。



(5) 電気泳動

① アガロースゲルの作製（1%ゲル、150 ml 作製の場合）

1. アガロース粉末を 1.5 g 量り取る。
2. 適切な大きさの容器中に室温または冷却したバッファー150 ml を用意し、バッファーを攪拌しながらアガロース粉末を加える。
3. ラップで覆った後、蒸気抜きの穴を開け、電子レンジにセットし加熱する。時々止めて攪拌し、完全に溶解する。
4. 加熱終了後、電子レンジから出し、静かに攪拌して均一にし泡を取り除く。
5. 溶液を室温において 50～60℃まで冷却し、コームをセットしたゲルトレイに流し入れる。ピペットチップなどで泡を取り除き。冷やし固める。
6. 適量のバッファーを重層後、コームを外し、泳動槽に移す。

② 電気泳動サンプルの準備

泳動サンプル溶液に 1/6 量の 6×Loading Buffer を加えてよく混合する。DNA 分子量マーカーも同様に準備する。

③ サンプル溶液のアプライ

ゲルのウェルに②のサンプル溶液をアプライする。

④ 電気泳動

泳動装置（パワーサプライ）のスイッチを入れて電気泳動を開始する。電流の向きに注意する（泳動上流側に陰極、下流側に陽極をセットする）。適度に分離した時点でスイッチを切る。

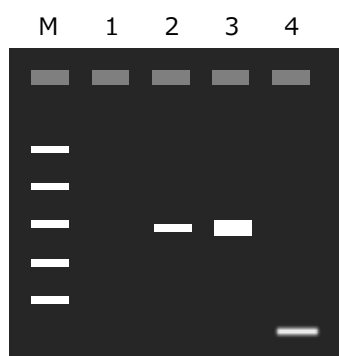
⑤ ゲルの染色

泳動後のゲルをエチジウムブロマイド（EtBr）、SYBR Green I などの染色液に浸す。

4 結果の解析

電気泳動結果の確認

電気泳動の結果が得られたら PCR 増幅産物の有無と増幅サイズを確認します。PCR 増幅産物のバンドが検出されても、目的のサイズと異なる場合は、陰性の判定となります。また、バンドの濃さは PCR 増幅産物の量を反映していますので、ある程度、初期鋳型量の目安となります。



M	サイズマーカー
1	反応液1のPCR産物
2	反応液2のPCR産物
3	反応液3のPCR産物
4	反応液4のPCR産物

1. 増幅産物が得られていない。
2. 想定されるサイズの増幅産物が得られている
3. 同上
4. 増幅産物は得られているが、想定されるサイズの増幅産物ではない